



ARTICULO ORIGINAL

Evaluación citotóxica y genotóxica de metabolitos secundarios de cultivos de bacterias aisladas en la región noroccidental de Cuba

Cytotoxic and genotoxic evaluation of secondary metabolites of bacterial cultures isolated in northwestern of Cuba

Ilianet Céspedes[1]
Yoskiel Laurencio[1]
Ivones Hernández-Balmaseda[1]
Fabiana Fuentes[2]
Valia Caballero[1]
Elizabeth Cuétara[3]
Miguel David Fernández[1]
Eudalys Ortiz[1*]
Idania Rodeiro[1*]

[1] Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR), Calle Loma #14 e/35 y 37, Alturas del Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba.

[2] Facultad Biología, Universidad de la Habana, 25 y J, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba.

[3] Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), 27 y E, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba.

Autores para correspondencia:
laly@icimar.cu
idania@icimar.cu

Editor:
Georgina Espinosa
FBIO.
Universidad de La Habana.

Recibido: 05.07.2022
Aceptado: 20.02.2023

Resumen

Los organismos marinos producen metabolitos secundarios bioactivos y son fuentes para la obtención de nuevos bioproductos de uso humano. Sin embargo, estos compuestos pudieran representar un riesgo para el hombre, por lo que resulta imprescindible realizar estudios que permitan descartar aquellos con efectos perjudiciales. En el presente trabajo, se evaluó el potencial de toxicidad *in vitro* de dos extractos secos (M1061 y M1063), obtenidos a partir de las cepas bacterianas del grupo de actinomicetos CBM-1061 y CBM-1063, aisladas de sedimentos de manglar de la península de Guanahacabibes, Cuba. Para ello, se evaluó el potencial citotóxico de los extractos en diferentes líneas celulares: MDCK, J774 (células derivadas de tejidos sanos) y CT26, 4T1, MCF-7 (de origen tumoral), mediante el ensayo de reducción de bromuro de dimetiltiazol-difeniltetrazolio (MTT) y en el modelo bacteriano *Caulobacter crescentus* a través del ensayo de sobrevivencia bacteriana. Se evaluaron, también, los posibles efectos sobre el material genético en *C. crescentus* (Ensayo SOS colorimétrico y resistencia a Rifampicina). Los extractos no fueron tóxicos en el rango de concentraciones evaluadas (1-2000 µg/mL) en *C. crescentus* ni en las líneas celulares hasta 1000 µg/mL después de 48 h de exposición. Tampoco resultaron genotóxicos (50-2000 µg/mL) ni mutagénicos (50-1000 µg/mL) en *C. crescentus*. Los resultados obtenidos muestran la no toxicidad de los extractos M1061 y M1063 bajo las condiciones de ensayo.

Palabras clave: microorganismos marinos, actinomicetos, citotoxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad.

Abstract

Marine organisms produce bioactive secondary metabolites andare sources for obtaining new bioproducts for human use. However, they can represent a risk for man, so

it is essential to carry out studies to rule out those with harmful effects. In the present work, the in vitro toxicity potential of two dry extracts (M1061 and M1063) obtained from the bacterial strains of the actinomycetes, CBM-1061 and CBM-1063, isolated from mangrove sediments of the Guanahacabibes peninsula, Cuba, was evaluated. For it, the cytotoxic potential of the extracts was evaluated in different cell lines: MDCK, J774 (from health tissues) and CT26, 4T1, MCF-7 (tumor cells) by using dimethylthiazol diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay and the *Caulobacter crescentus* bacterial model through the bacterial survival test. The possible effects on the genetic material in *C. crescentus* were also evaluated (SOS colorimetric test and resistance to Rifampicin). The extracts were not toxic in the range of concentrations evaluated (1-2000 µg/mL) in *C. crescentus*, neither in the cell lines up to 1000 µg/mL after 48 hours of exposure. They were no genotoxic (50-2000 µg/mL) normutagenic (50-1000 µg/mL) in *C. crescentus*. The results obtained show the non-toxicity of M1061 and M1063 extracts under the experimental conditions.

Keywords: Marine microorganisms, actinomycetes, cytotoxicity, mutagenicity, genotoxicity.

Introducción

Los organismos marinos habitan y sobreviven en un medio exigente, competitivo, y bajo condiciones ecológicas estresantes. Para ello, realizan ajustes bioquímicos y fisiológicos produciendo metabolitos secundarios que les permiten responder a esas condiciones, defenderse de sus depredadores, comunicarse y reproducirse. Tales evidencias han llevado a pensar que estas estructuras químicas pudieran tener una variedad de propiedades farmacológicas con utilidad clínica (Galeano *et al.*, 2011; Newman y Cragg, 2017).

Varios estudios han revelado que los metabolitos secundarios provenientes de microorganismos marinos presentan propiedades bioactivas con valor terapéutico como antibióticos, antitumorales y antivirales, entre otros (León *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2017; Nathan y Kannan, 2020). Un tamizaje farmacológico realizado en el Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR) mostró que dos extractos obtenidos a partir de metabolitos secretados por las cepas bacterianas del grupo de actinomicetos CBM-1061 y CBM-1063, aisladas de zonas de manglar de la costa sur de Cuba, poseen promisoria actividad antiinflamatoria, antimicrobiana y capacidad intercalante del ADN (Hernández-Balmaseda *et al.*, 2019). Esos hallazgos centraron la atención sobre estos extractos como potenciales candidatos para la obtención de nuevos fitofármacos y nutracéuticos. Sin embargo, en el transcurso de la evaluación de un nuevo producto que se propone para su uso en humanos resulta imprescindible no solo investigar acerca de sus efectos beneficiosos, es necesario conocer su potencial de toxicidad para definir el margen riesgo-beneficio. A pesar de que la calidad de vida del hombre se ha visto mejorada por productos naturales, en algunos casos, la exposición a estos pudiera estar relacionada con determinados riesgos debido a su toxicidad (Stopper *et al.*, 2005), razón por la cual resulta imprescindible realizar estudios toxicológicos que permitan establecer el margen de seguridad de estos compuestos (Parker y Browne, 2014). En esta dirección, los estudios de toxicidad *in vitro* se encuentran entre las primeras pruebas no clínicas propuestas para acometer la evaluación toxicológica de los nuevos candidatos. Dentro de estos ensayos, las evaluaciones citotóxicas y genotoxicológicas forman parte de la batería de estudios requeridos previo a la exposición a nuevos productos farmacéuticos, plaguicidas, cosméticos y otros productos químicos (Kirkland *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2018). Por tales motivos, el presente trabajo se propuso evaluar el potencial citotóxico y genotóxico de los extractos M1061 y M1063 obtenidos a partir de los metabolitos secundarios secretados por microorganismos marinos de las cepas CBM-1061 y CBM-1063 en dos modelos experimentales: bacteriano *Caulobacter crescentus* y líneas celulares (MDCK, J774, CT26, 4T1, MCF-7).

Materiales y métodos

Microorganismos empleados

Los cultivos de bacterias CBM-1061 y CBM-1063 fueron aislados de los sedimentos de zonas de manglar de la península de Guanahacabibes, en la región noroccidental de Cuba. Estos cultivos se encuentran depositados en la Colección de Bacterias Marinas del Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR), La Habana, Cuba.

Obtención de los extractos

Los extractos secos exocelulares, denominados M1061 y M1063, respectivamente para cada bacteria, se obtuvieron a partir de cultivos sumergidos en caldo nutriente a 120 rpm en zaranda orbital (Infors HT Ecotron) por cinco días a 30 ± 2°C. Posteriormente, los cultivos fueron filtrados a través de membranas de 0.2 µm y concentrados hasta sequedad por rotoevaporación a presión reducida de 1 atm a 60°C.

Evaluación del potencial citotóxico y genotóxico en el modelo bacteriano C. crescentus

Se empleó la cepa NA1000 p3213 *lacZ* de *C. crescentus* donada por el Departamento de Microbiología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de São Paulo, Brasil. Fue crecida en medio PYE (Peptone Yeast Extract, del inglés), suplementado con $CaCl_2$ 0.5 mmol/L y tetraciclina 2 µg/mL, e incubado por 16 h a 30 ± 2°C y 120 rpm en zaranda orbital (Ely, 1991).

El cultivo a concentración de DO de 0.4 ($6x10^7$ células/mL) a 600 nm se centrifugó a 12x4 g durante 5 minutos en una centrífuga MiniSpin para eppendorf. El precipitado celular se resuspendió en medio PYE, conteniendo diferentes concentraciones de los extractos para evaluar su posible citotoxicidad (1-2000 µg/mL) y genotoxicidad (50-2000 µg/mL). Como control negativo, se emplearon células en medio PYE suplementado, y, como control positivo, las células se expusieron a la dosis de 45 J/m^2 de luz UV-C. Los tratamientos y controles se incubaron durante 30 min a 4°C y seguidamente durante 2 h a 30°C y agitación constante a 120 rpm en zaranda orbital. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12x4 g durante 5 minutos en una centrífuga MiniSpin para eppendorf, y el precipitado celular se resuspendió en medio PYE suplementado para realizar las evaluaciones correspondientes.

La posible citotoxicidad inducida por M1061 y M1063 se determinó a partir de la viabilidad de *C. crescentus* (Galhardo *et al.*, 2005). La sobrevivencia bacteriana se determinó a partir del cálculo del porcentaje de colonias viables crecidas en las diferentes placas, según la fórmula:

% sobrevivencia celular = (No. colonias tratamientos/ No. colonias control) x 100, donde:

No. colonias tratamientos: representa el número de colonias crecidas después de la exposición de *C. crescentus* a las concentraciones del extracto de *T. testudinum*.

No. colonias control: representa el número de colonias de *C. crescentus* crecidas en medio cultivo suplementado solo, control negativo.

El daño primario producido por los extractos (50-2000 µg/mL) se evaluó mediante el ensayo SOS colorimétrico según Galhardo *et al.* 2005, a partir de determinar la actividad de la enzima β-galactosidasa (AE), criterio de daño primario al ADN. La actividad enzimática se determinó a partir de la fórmula: AE = $DO_{420\,nm}$ x 1000/$DO_{600\,nm}$ x vol x t, donde:

$DO_{420\,nm}$: valor de densidad óptica a 420 nm

$DO_{600\,nm}$: valor de densidad óptica a 600 nm

vol: Volumen de incubación (0,05 mL)

t: Tiempo de reacción enzimática (5 min)

El potencial mutagénico de los extractos se evaluó mediante el ensayo de resistencia de *C. crescentus* a la Rifampicina (Rif^R) (Galhardo *et al.*, 2005). La frecuencia de células mutadas (FCM) se determinó mediante la ecuación: FCM = No. colonias mutantes/No. colonias totales, donde:

No. colonias mutantes: representa el número de colonias crecidas en medio suplementado con rifampicina y No. de colonias totales: representa el número de

colonias crecidas en medio sin rifampicina para el mismo tratamiento.

Evaluación del potencial citotóxico en líneas celulares

Las líneas celulares de origen no tumoral (MDCK, riñón canino de CookerSpaniel de Maden y Darby, y J774, macrófagos murinos) y tumoral (CT26, carcinoma colon murino; 4T1, tumor mama murino; MCF-7, tumor mama humano) se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM, suplementado con suero fetal bovino (10%), glutamina (2mmol/L) y antibióticos (1%) en atmósfera húmeda con 5% CO_2 a 37ºC.

La citotoxicidad de M1061 y M1063 se evaluó mediante el ensayo de MTT (Mosmann, 1983). Se determinó la viabilidad de las células expuestas a los extractos (1-1000 µg/mL) por 48 h. Concluido este período, las células se lavaron con PBS al 1%, se añadió medio con MTT (5 mg/mL) y se incubó durante 4 h. Los cristales de formazán formados se solubilizaron con DMSO y se determinó la DO a 550 nm. A partir de los valores de DO obtenidos, se calculó el porcentaje de viabilidad celular para las diferentes concentraciones evaluadas y para cada tipo celular, mediante la utilización de la siguiente fórmula: % = (DO tratados/DO control) x 100, donde:

DO tratados: valor de densidad óptica a 550 nm de las células tratadas

DO control: valor de densidad óptica a 550 nm de las células crecidas en medio, sin tratamiento

Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism, versión 5. Los valores fueron expresados como las medias ± desviación estándar (DE). Se procesaron resultados al menos de dos experimentos y tres réplicas. En cada caso, se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianza de los datos mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente. Para comparar las medias, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Cuando se obtuvieron diferencias, se aplicó la prueba de *Dunnett*. Valores de **$p<0.01$; ***$p<0.001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Evaluación citotóxica y genotóxica en C. crescentus

La posible actividad tóxica de los extractos M1061 y M1063 se evaluó mediante el Ensayo de Sobrevivencia bacteriana, empleando el modelo bacteriano *C. crescentus*. El porcentaje de sobrevivencia, calculado a partir del número de colonias formadas tras ser expuestas las células a las diferentes concentraciones de los extractos (1-2000 µg/mL), mostró que, hasta la mayor concentración evaluada, los tratamientos no conllevaron a cambios significativos del crecimiento celular con respecto al porcentaje de células no expuestas y crecidas en medio de cultivo sin tratamiento (asumido como 100%) (Fig. 1). Estos resultados mostraron que los extractos M1061 y M1063 no produjeron efectos tóxicos bajo las condiciones experimentales ensayadas.

Los posibles efectos genotóxicos que pudieran causar los extractos M1061 y M1063 se determinaron mediante el ensayo SOS Colorimétrico en *C. crescentus*. En la Fig. 2, se muestran los valores de la actividad de la enzima β-galactosidasa en las células bacterianas luego de ser tratadas con las concentraciones (50, 500, 1000, 2000 µg/mL) de los extractos, como medida de la capacidad de inducción de la respuesta SOS en *C. crescentus*. Los valores de actividad β-galactosidasa para los extractos evaluados no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo.

La posible actividad mutagénica de los extractos M1061 y M1063 se determinó mediante el ensayo de Resistencia a Rifampicina (Rif^R). En la Fig. 3, se muestran los valores de la frecuencia de colonias mutadas (FCM) determinados tras la exposición de las células

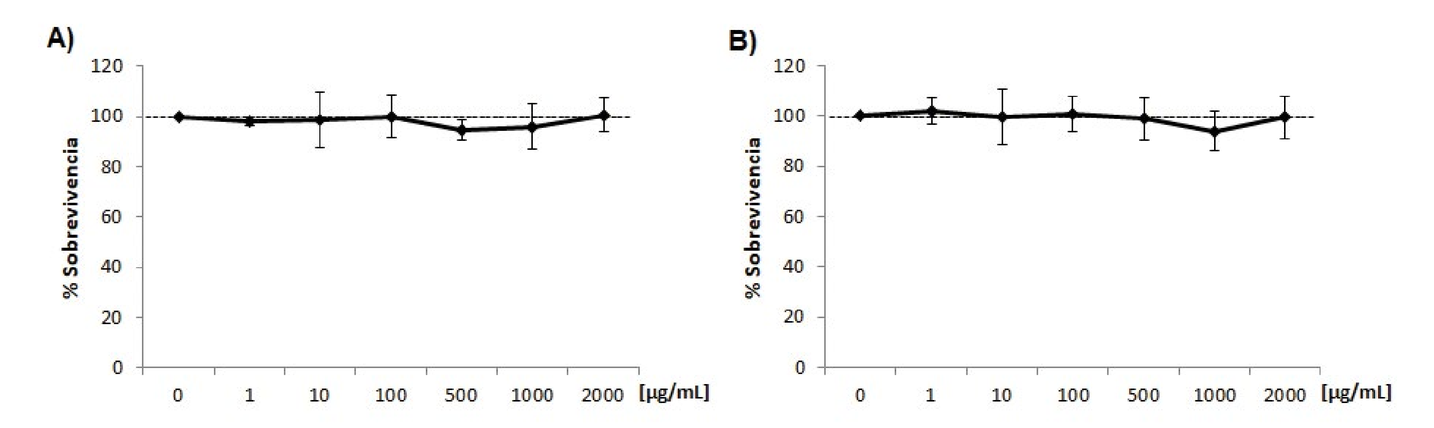


Fig 1. Efectos de diferentes concentraciones de los extractos M1061 (A) y M1063 (B) sobre la capacidad de formar colonias de *C. crescentus*. La línea discontinua representa el 100% de sobrevivencia del control (células en medio de cultivo). Se presentan los datos de media y desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos respecto al control, p 0.05 (Prueba de *Dunnett*).

bacterianas a las concentraciones (50-1000 µg/mL) de los extractos. Como puede observarse, la exposición de *C. crescentus* a las distintas concentraciones evaluadas de M1061 y M1063 produjo un ligero incremento de la FCM. Sin embargo, este aumento de aparición de mutantes no resultó estadísticamente significativo con respecto a la FCM observada en las células crecidas en el medio de cultivo sin tratamiento, por lo que es posible sugerir que bajo estas condiciones de ensayo los extractos M1061 y M1063 no resultaron mutagénicos.

Citotoxicidad en líneas celulares

Los posibles efectos citotóxicos de M1061 y M1063 fueron evaluados empleando diferentes líneas celulares

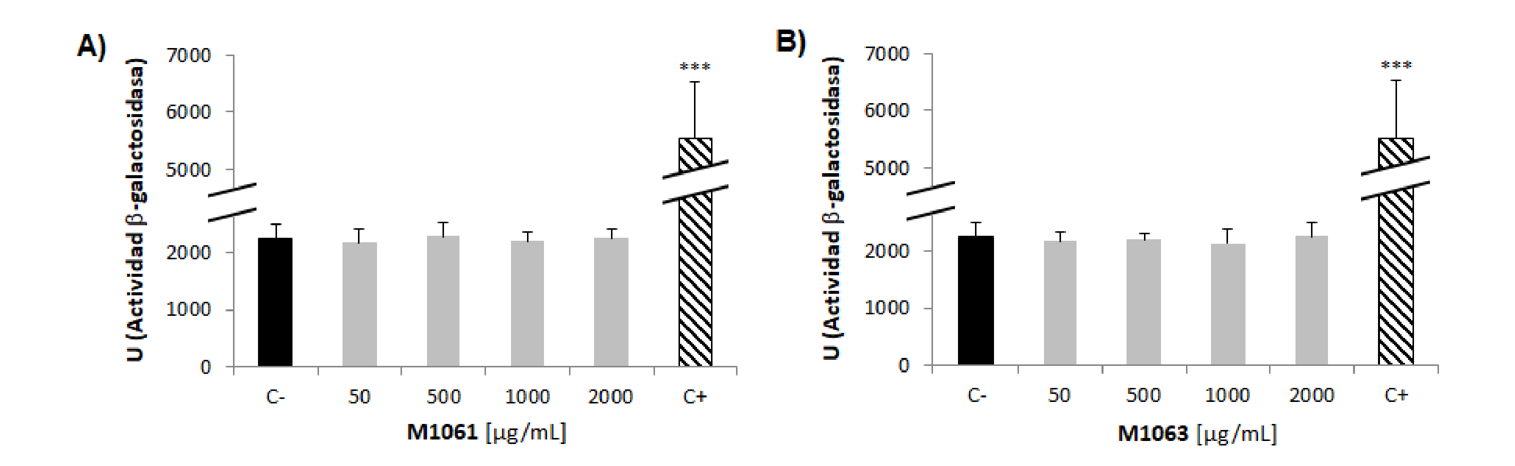


Fig 2. Actividad de la enzima β-galactosidasa en células de *C. crescentus* tratadas con diferentes concentraciones de los extractos M1061 (A) y M1063 (B). C- (control negativo): células expuestas solo al medio de cultivo. C+ (control positivo): células que recibieron una dosis de irradiación UV-C (λ=254 nm) de 45 J/m^2. Se presentan los datos de media y desviación estándar, ***$p < 0.001$ (Prueba de *Dunnett*).

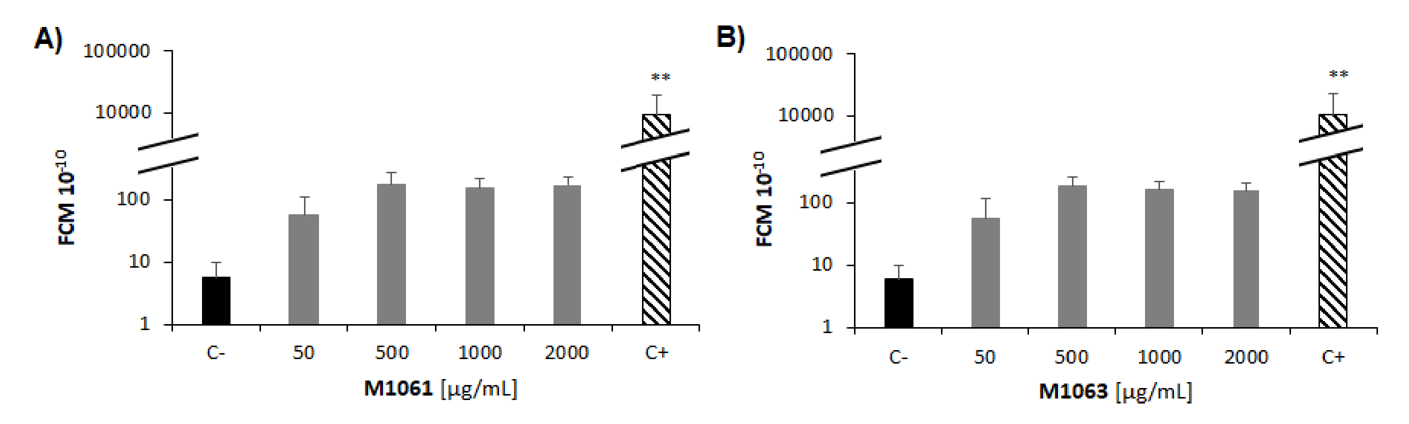


Fig. 3. Frecuencia de colonias mutadas (FCM) en células de *C. crescentus* expuestas a los extractos M1061 (A) y M1063 (B). C-, células expuestas solo al medio de cultivo. (C+): células que recibieron una dosis de irradiación UV (λ=254 nm) de 45 J/m^2. Se presentan datos de media y desviación estándar en escala logarítmica, **p< 0.01 (Prueba de *Dunnett*).

de origen tumoral (CT26, 4T1, MCF-7) y no tumoral (MDCK y J774), y se utilizó como medida de la viabilidad celular la reducción del MTT. Al concluir el período de exposición de las diferentes células a los dos extractos hasta la concentración máxima evaluada (1000 µg/mL), se observó que en ningún caso los tratamientos afectaron la vialidad celular tras las 48 h de incubación (Fig. 4). La concentración que inhibe el 50 % de la viabilidad, comúnmente conocida como CI_{50}, no pudo ser determinada. De esta manera, los extractos M1061 y M1063 tampoco resultaron tóxicos a nivel celular bajo las condiciones de ensayo.

Discusión

La bioprospección marina ha informado un gran número de moléculas que pueden ser aplicadas en el mejoramiento de la salud humana. Dentro de las investigaciones desarrolladas, diferentes estudios han sido conducidos para conocer acerca de las propiedades bioactivas de metabolitos secundarios que producen cepas

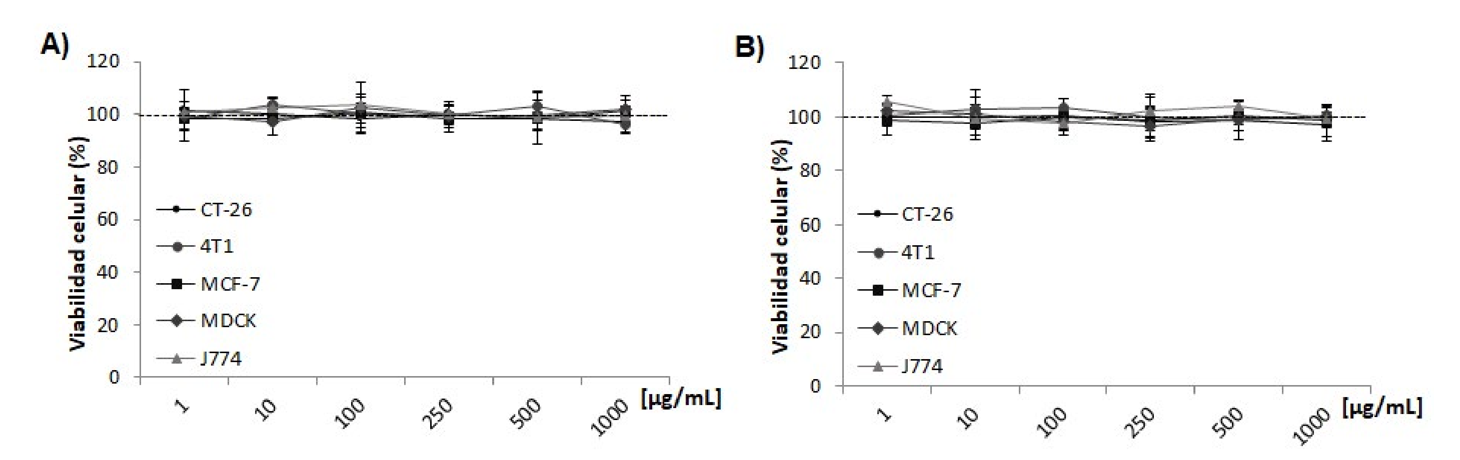


Fig. 4. Efectos de los extractos M1061 (A) y M1063 (B) sobre la viabilidad celular mediante el Ensayo de MTT. Líneas celulares de origen no tumoral (MDCK, riñón canino de CookerSpaniel de Maden y Darby; J774, macrófagos murinos) y tumoral (CT26, carcinoma colon murino; 4T1, tumor mama murino; MCF-7, tumor mama humano). Se muestra el porcentaje de viabilidad celular respecto al control, células no expuestas a los extractos (la línea discontinua representa el 100% viabilidad celular). No se encontraron diferencias significativas respecto al control, p> 0.05 (Prueba de *Dunnett*).

bacterianas de origen marino, entre las que se incluyen los actinomicetos (León *et al.*, 2010; Blunt *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019). De ellos, hasta hace poco, los sedimentos marinos han sido de los recursos menos explorados; sin embargo, hoy en día constituyen una de las fuentes más promisorias (Fenical y Jensen, 2006; León *et al.*, 2011). Los sedimentos son productores de metabolitos con actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral, antitumoral y citotóxica, cuyas estructuras químicas son únicas (Kekuda *et al.*, 2010; Jagannathan *et al.*, 2021). Estudios realizados avalan las potencialidades farmacológicas de dos extractos obtenidos de los metabolitos secretados por las cepas bacterianas del grupo de actinomicetos CBM-1061 y CBM-1063, aisladas de sedimentos de la península de Guanahacabibes, un área con reconocida diversidad en organismos marinos en la región noroccidental de Cuba (Fernández, 2012). M1061 como M1063 exhiben actividad antiinflamatoria (Hernández-Balmaseda *et al.*, 2019), una propiedad que es prioridad en la búsqueda de nuevos fármacos, dado el papel de los procesos inflamatorios en el desarrollo de numerosas enfermedades de elevada morbilidad y mortalidad a nivel mundial, y el hecho de que el arsenal de fármacos antiinflamatorios existentes no muestra la eficacia y seguridad esperadas (Gunter *et al*., 2017). Estos extractos poseen también actividad antimicrobiana y capacidad intercalante del ADN (Hernández-Balmaseda *et al.*, 2019). La cepa CBM-1063 muestra capacidad para producir la enzima L-asparaginasa. Las células tumorales, a diferencia de las células normales, dependen de una fuente exógena del aminoácido L-asparagina para su crecimiento (Rudrapati y Audipudi, 2015). Esta enzima evita la formación del aminoácido e inhibe, por ende, el crecimiento tumoral. Su síntesis como metabolito secundario ha mostrado actividad antineoplásica, particularmente en la Leucemia linfoblástica aguda (Jain *et al.*, 2012). La obtención de la enzima con fines terapéuticos a partir de microorganismos constituye una tecnología atractiva como parte del control de la enfermedad. Estas evidencias experimentales convierten a los extractos M1061 y M1063 en promisorios candidatos a fármacos de uso humano. Sin embargo, los compuestos naturales, ya sean obtenidos de fuentes terrestres o marinas, no están exentos de efectos adversos (Sripriya *et al.*, 2019). Es por ello que en el transcurso de la evaluación de un nuevo producto natural, que se propone para su uso en humanos, resulta imprescindible no solo investigar sus efectos beneficiosos, sino también su potencial de toxicidad, empleando baterías de ensayos que aborden la investigación desde diferentes niveles de organización de las estructuras biológicas. Este trabajo muestra los primeros datos acerca del potencial de toxicidad *in vitro* de estos extractos ricos en metabolitos secundarios bioactivos.

La medida del crecimiento bacteriano a través del conteo de colonias formadas tras la exposición a un compuesto permite conocer si la exposición al xenobiótico afecta la viabilidad celular, lo que es criterio de toxicidad. La exposición a los extractos M1061 y M1063 hasta concentraciones elevadas, como 2000 μg/mL, no afectó el crecimiento celular de *C. crescentus* (Fig. 1). De igual manera, tampoco se afectó la viabilidad de las líneas celulares (Fig.4), por lo que ambos ensayos evidencian la no citotoxicidad de los extractos evaluados y constituyen los primeros datos acerca del margen de seguridad de estas mezclas de metabolitos secundarios marinos.

Por otro lado, también es ampliamente conocido que la evaluación citotóxica de los nuevos compuestos, donde se incluyen los productos naturales, si se evalúan los efectos sobre células tumorales, no solo aporta datos de seguridad, también proporciona evidencias acerca de sus potencialidades como candidatos para la obtención de agentes antitumorales. Son notables los efectos anticancerígenos de los actinomicetos (Jagannathan *et al.*, 2021). A partir de cepas de *Streptomyces,* se han desarrollado fármacos eficaces en la terapéutica del cáncer como son la adriamicina, la actinomicina D, la bleomicina, las antraciclinas

(daunorrubicina) y los mitosanos (mitomicina C) (Sharma *et al.*, 2018). Mientras, que son varios los metabolitos secundarios con potencial antitumoral aislados de actinomicetos marinos (Nathan y Kannan, 2020). Ejemplos son los compuestos ULDF4 y ULDF5, extraídos de derivados de cepas de *Streptomyces* encontradas en Lagos que exhiben toxicidad contra células de leucemia promielocítica y mielocítica aguda humana, carcinoma cervical y gástrico humano y de adenocarcinoma de mama (Davies-Bolorunduro *et al.*, 2019). Especial interés se ha centrado en aquellos cuya bioactividad va acompañada de mínimos eventos secundarios en comparación con la quimioterapia convencional, como es el caso de salinosporamida A (Feling *et al.*, 2003). Este es un compuesto aislado de los caldos de fermentación del grupo de actinomicetos *Salinospora* (Fenical y Jensen, 2006). Este grupo de actinomicetos que habita en las grandes profundidades ha revolucionado el concepto de diversidad química asociada a nuevos géneros en bacterias, inhiben de manera específica el proteasoma (Groll *et al.*, 2006) y muestran prometedores resultados frente a cáncer de colon, mama y pulmón no microcítico. Hallazgos que coinciden con las evidencias existentes acerca de productos anticancerígenos no citotóxicos *per se,* que exhiben su modo de acción farmacológica al modular otros blancos relacionados con el desarrollo tumoral, como es el caso de la inhibición del proceso angiogénico y de la respuesta inflamatoria que tiene lugar en el microambiente tumoral (Bellan *et al.*, 2020). Tal es el caso del extracto obtenido de las hojas de la angiosperma marina *Thalassia testudinum* que habita en las costas de Cuba. Si bien este extracto inhibe la viabilidad de diferentes estirpes celulares de origen tumoral, no puede clasificarse como un producto citotóxico, mientras que muestra propiedades antiangiogénicas, antiinflamatorias e inhibe la migración celular, y destaca como un potencial agente antitumoral y antimetastásico (Rodeiro y cols., 2018; Hernández y cols., 2021). Otro ejemplo de este tipo de compuestos es la cetomicina que suprime la migración celular y la invasión de las células de carcinoma de mama, inhibe la actividad NF-κB y minimiza la invasión de las células tumorales a concentraciones no tóxicas (Lin *et al.*, 2019).

En el presente estudio, en concordancia con la escasa citotoxicidad observada, bajo las condiciones de experimentación ensayadas, los extractos M1061 y M1063 tampoco resultaron genotóxicos ni mutagénicos en el modelo bacteriano *C. crescentus*. Los ensayos que se basan en la utilización de fusiones con promotores de genes SOS han sido ampliamente empleados como indicadores de daño genético. Dentro de estos, el ensayo SOS Colorimétrico estima el daño primario al ADN a través de la medida de la expresión de un gen marcador fusionado al promotor de un gen de respuesta SOS (Quillardet *et al.*, 1982). Los valores de actividad β-galactosidasa obtenidos sugieren que los extractos evaluados no producen daño primario al ADN, o al menos que las posibles lesiones que se generan tras la exposición a estos son reparables; por ende, no se desencadena la respuesta SOS en *C. crescentus*. El ensayo de Resistencia a Rifampicina (Rif^R) se fundamenta en la inducción de mutaciones en el gen rpoB que codifica para la ARN polimerasa e inhibe el alargamiento durante la transcripción (Campbell *et al.*, 2001). La rifampicina en el medio impide la transcripción y hace a la bacteria resistente al antibiótico. La siembra selectiva se relaciona a la cantidad de células mutantes del total de sobrevivientes y es reconocido criterio de mutagenicidad (Galhardo *et al.*, 2005; Lopes-Kulishev *et al.*, 2015; Fuentes-León *et al.*, 2017). El hecho de que M1061 y M1063 no resultaron mutagénicos en este ensayo refuerza lo observado en el ensayo SOS en *C. crescentus*, mientras que resultados previos muestran que estos poseen capacidad intercalante del ADN (Hernández-Balmaseda *et al.*, 2019), evidencias experimentales que avalan la necesidad de realizar una batería de pruebas a la hora de predecir el potencial de toxicidad de los nuevos compuestos para emitir criterios de riesgos más certeros y robustos. Extractos obtenidos también de fuentes

marinas cubanas han sido evaluados empleando estas baterías de ensayo. Por ejemplo, la exposición de diferentes células tumorales a M116, un extracto seco obtenido a partir del caldo fermentado de la cepa CBM-116, disminuye la viabilidad celular de diferentes estirpes celulares. Sin embargo, M116 no clasifica como agente citotóxico, mientras que a concentraciones en el orden de 2000 µg/mL induce mutagenicidad y daño primario al ADN en *C. crescentus* (datos no publicados).

Por otro lado, aunque la exposición de las células tumorales a M1061 y M1063 durante 48 h no provocó inhibición del crecimiento celular, además de los elementos anteriormente enunciados, no debe descartarse la posibilidad que actúen inhibiendo la viabilidad de células tumorales de otros linajes a las aquí evaluadas. Todo lo cual sugiere que deberían ser conducidos nuevos estudios que permitan continuar aportando evidencias acerca de los posibles efectos beneficiosos y tóxicos de estos bioproductos que pueden ser promisorias fuentes de novedosos agentes terapéuticos eficaces y seguros.

Conclusiones

La evaluación del potencial de toxicidad *in vitro* de los extractos secos M1061 y M1063, obtenidos a partir de cepas bacterianas del grupo de actinomicetos procedentes de sedimentos de manglar de la península de Guanahacabibes, mostró que estos bioproductos no son citotóxicos, ni mutagénicos, ni genotóxicos bajo las condiciones de ensayo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Programa Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación "Uso sostenible de los componentes de la diversidad biológica en Cuba", a través del Proyecto "Evaluación de las potencialidades farmacológicas de metabolitos obtenidos a partir de microorganismos de ecosistemas marinos" (P211LH005-016), AMA, CITMA, 2016-2018.

Declaraciones

Contribución de los autores

Conceptualización: IR, EO; Metodología: IC, YL, IH-B, FF, EC; Análisis formal: IC, YL, IH-B, FF, MDF; Investigación: IC, YL, IH-B, FF, VC, EC, MDF; Recursos: IR, EO; Curación de datos IC, YL, IH-B, FF, VC, EC,MDF, Escritura original "Preparación del borrador": IC, YL; Escritura-Revisión y edición: IH-B, FF, EC, MDF, EO, IR; Visualización: IR, EO; Supervisión: IR, EO; Administración del proyecto: IH-B, EO; Adquisición de fondos: IH-B, IR.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de investigación: "Evaluación de las potencialidades farmacológicas de metabolitos obtenidos a partir de microorganismos de ecosistemas marinos". P211LH005-016, AMA, CITMA.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses financieros o no financieros que declarar que sean relevantes para el contenido del manuscrito.

Comportamiento ético

No se utilizaron animales de experimentación.

Permisos de muestreo

El autor ha recibido de las autoridades pertinentes los permisos necesarios para realizar los muestreos.

Referencias bibliográficas

Bellan, D., Mazepa, E., Biscaia, S., Gonçalves, J., Oliveira, C., Rossi, G., Duarte, M. (2020). Non-cytotoxic sulfated heterorhamnan from Gayralia brasiliensis green seaweed reduces driver features of melanoma metastatic progression. *Mar. Biotechnol.*, *22* (2), 194-206.

Blunt, J. W., Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A. y Prinsep, M. R. (2018). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep., 35* (1), 8-53.

Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A. y Darst, S. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell. 104* (6), 901-912.

Davies-Bolorunduro, O. F., Adeleye, I. A., Akinleye, M. O. y Wang, P. (2019). Anticancer potential of metabolic compounds from marine actinomycetes isolated from Lagos Lagoon sediment. *JPA. 9* (3), 201-208.

Ely, B. (1991). Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods in enzymology*, *204*, 372-384.

Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. y Fenical, W. (2003). Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew. Chem.-Int. Edit., 42* (3), 355-357.

Fenical, W. y Jensen, P. (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.*, *2* (12), 666-673.

Fernández, F. D. (2012). Uso potencial de las especies vegetales de la Reserva de la Biosfera Península de Guanahacabibes. *Revista ECOVIDA*, *3* (1), 60-73.

Fuentes-León, F., García-Fernández, F., Aguilera-Roque, K. B., da Silva Galhardo, R., Menck, C. F. M. y Sánchez-Lamar, Á. (2017). Fotoprotección del DNA ejercida por fracciones obtenidas de *Cymbopogon citratus* (Poaceae)/ DNA photoprotection exerted by chemical fractions obtained from *Cymbopogon citratus* (Poaceae). *Rev. Cub. Cienc. Biol.* 5 (3), 9.

Galeano, E., Rojas, J. J. y Martinez, A. (2011). Pharmacological developments obtained from marine natural products and current pipeline perspective. *Nat. Prod. Commun.*, *6* (2), 287-300.

Galhardo, R. S., Rocha, R. P., Marques, M. V. y Menck, C. F. (2005). An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res., 33* (8), 2603-2614.

Groll, M., Huber, R. y Potts, B. (2006). Crystal structures of salinosporamide A (NPI-0052) and B (NPI-0047) in complex with the 20S proteasome reveal important consequences of β-lactone ring opening and a mechanism for irreversible binding. *J. Am. Chem. Soc., 128* (15), 5136-5141.

Gunter, B. R., Butler, K. A., Wallace, R. L., Smith, S. M., & Harirforoosh, S. (2017). Non-steroidal anti-inflammatory drug induced cardiovascular adverse events: a meta-analysis. *J. Cli. Pharm. Ther.*, *42*(1), 27-38.

Hernández-Balmaseda, I., Rodeiro, I., Ortiz, E., Núñez, R. R., Fernández, M. D., Riera, M., Rodríguez, G. (2019). *Informe anual de resultados. Proyecto P211LH005-016: Evaluación de las propiedades farmacológicas de metabolitos obtenidos a partir de microorganismos de ecosistemas marinos con potencialidades de aplicación en enfermedades crónicas no trasmisibles, 2016-2018*. Agencia de Medio Ambiente (AMA) (Ed.): Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR).

Hernández-Balmaseda, I., Guerra, I. R., Declerck, K., Herrera Isidrón, J. A., Pérez-Novo, C., Van Camp, G., ... & Vanden Berghe, W. (2021). Marine seagrass extract of *Thalassia testudinum* suppresses colorectal tumor growth, motility and angiogenesis by autophagic stress and immunogenic cell death pathways. *Marine Drugs*, 19(2), 52.

Jagannathan, S. V., Manemann, E. M., Rowe, S. E., Callender, M. C. y Soto, W. (2021). Marine actinomycetes, new sources of biotechnological products. *Mar. Drugs*, *19* (7), 365.

Jain, R., Zaidi, K. U., Verma, Y., & Saxena, P. (2012). L-asparaginase: A promising enzyme for treatment of acute lymphoblastic leukiemia. *People's Journal of Scientific Research*, *5*(1), 29-35.

Kekuda, T. P., Shobha, K. y Onkarappa, R. (2010). Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J. Pharm. Res.*, *3* (2), 250-256.

Kirkland, D., Henderson, L., Marzin, D., Müller, L., Parry, J., Speit, G., Tweats, D.J., Williams, G. M. (2005). Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, *588* (2), 88-105.

León, J., Liza, L., Soto, I., Torres, M. y Orosco, A. (2010). Bacterias marinas productoras de compuestos

antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica*, *27* (2), 215-221.

León, J., Aponte, J. J., Rojas, R., Cuadra, D., Ayala, N., Tomás, G. y Guerrero, M. (2011). Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica*, *28* (2), 237-246.

Lin, Y., Chen, Y., Ukaji, T., Okada, S. y Umezawa, K. (2019). Isolation of ketomycin from Actinomycetes as an inhibitor of 2D and 3D cancer cell invasion. *The J. Antibiot., 72* (3), 148-154.

Lopes-Kulishev, C. O., Alves, I. R., Valencia, E. Y., Pidhirnyj, M. I., Fernandez-Silva, F. S., Rodrigues, T. Guzzo, C., Galhardo, R. (2015). Functional characterization of two SOS-regulated genes involved in mitomycin C resistance in *Caulobacter crescentus*. *DNA repair. 33*, 78-89.

Mayer, A., Rodríguez, A. D., Taglialatela-Scafati, O. y Fusetani, N. (2017). Marine pharmacology in 2012–2013: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar. drugs, 15* (9), 273.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, *65* (1-2), 55-63.

Nathan, J. y Kannan, R. (2020). Antiangiogenic molecules from marine actinomycetes and the importance of using zebrafish model in cancer research. *Heliyon*, *6* (12), e05662.

Newman, D. J. y Cragg, G. M. (2017). Current status of marine-derived compounds as warheads in anti-tumor drug candidates. *Mar. drugs*, *15*(4), 99.

Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H. y Wang, H. (2019). Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: a literature review. *Front. Microbiol.*, *10*, 294.

Parker, R. M. y Browne, W. (2014). The place of experimental design and statistics in the 3Rs. *ILAR journal*, *55* (3), 477-485.

Quillardet, P., Huisman, O., D'ari, R. y Hofnung, M. (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci., 79* (19), 5971-5975.

Rodeiro, I., Hernández, I., Herrera, J. A., Riera, M., Donato, M. T., Tolosa, L., ... & Lopes, M. (2018). Assessment of the cytotoxic potential of an aqueous-ethanolic extract from *Thalassia testudinum* angiosperm marine grown in the Caribbean Sea. *J. Pharm. Pharmacol.*, *70*(11), 1553-1560.

Rudrapati, P., & Audipudi, A. V. (2015). Characterization and bioprocessing of oncolytic enzyme—L-asparaginase isolated from marine Bacillus AVP 14. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, *30*, 195-201.

Sripriya, N., Ranjith, M., Ashwin, N., Bhuvaneswari, S., Udaya, K. (2019). *In silico* evaluation of multispecies toxicity of natural compounds. *Drug. Chem. Toxicol., 44* (5), 480-486.

Sharma, P., Dutta, J. y Thakur, D. (2018). Future Prospects of Actinobacteria in Health and Industry. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. (305-324).

Stopper, H., Schmitt, E., Kobras, K. (2005). Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutat. Res. -Fundam. . Mol. Tech. Mutagen.*, *574* (1-2), 139-155.

Yamada, M., Honma, M. J. G. y Environment. (2018). Summarized data of genotoxicity tests for designated food additives in Japan. *Genes Environ.*, *40* (1), 1-28.

Como citar este artículo

Céspedes, I., Laurencio, Y., Hernández-Balmaseda, I., Fuentes, F., Caballero, V., Cuétara, E., Fernández, M.D., Ortiz, E.,Rodeiro, I. (2023). Evaluación citotóxica y genotóxica de metabolitos secundarios de cultivos de bacterias aisladas en la región noroccidental de Cuba. *Rev. Invest. Mar.*, *43*(1), 01-11.